

<平成 28 年度助成>

## バイオフィルム剥離効果が高い香辛料抽出物の探索

上田 晃弘

(広島大学大学院 生物圏科学研究科)

### 緒言

う蝕は口腔内病原性細菌の活動によって引き起こされる。ある種の口腔内細菌は歯の表面にバイオフィルムを形成することで強固に付着し、酸を放出することで歯質を脱灰する。虫歯菌 *Streptococcus mutans* はバイオフィルム形成能が高く、う蝕を引き起こす原因細菌の一種であると考えられている。バイオフィルムは細菌が放出する粘性多糖類に細菌自身を取り込まれた膜状構造物であり、細菌の歯表面での定着性を向上させる。また、細菌はバイオフィルム内でゆっくりと増殖し、バイオフィルム構造を発達させることが知られている。このようにバイオフィルムは細菌の定着性や増殖に重要な役割を果たしているため、う蝕を予防するためには *S. mutans* のバイオフィルム形成を抑制することや、すでに形成されたバイオフィルムを剥離させることが重要である。本研究では *S. mutans* が形成したバイオフィルムの剥離効果を持つ香辛料抽出物の探索を行った。*S. mutans* のバイオフィルム形成阻害効果も併せて検証することで、う蝕予防に効果的な香辛料の同定を試みた。

### 材料および方法

#### 1. 供試材料

本研究では 18 種類の香辛料（オレガノ、カイエンペッパー、キャッサバ、クミン、クローブス、コリアンダー、サンショウ、スターアニス、タイム、ターメリック、トウガラシ、バジル、ピンクペッパー、ブラックペッパー、ベイリーフ、ホワイトペッパー、

マスタードシード、ローズマリー）を使用した（株式会社ギャバン、エスビー食品株式会社、Amark All Spice Company Inc. 製）。供試細菌には *Streptococcus mutans* NBRC13955（独立行政法人製品評価技術基盤機構より分譲）を用いた。

#### 2. 試料調整

供試材料の一部は粉碎機（IFM-800、岩谷産業株式会社）を用いて粉碎した。粉碎試料 5 g に 20 mL のメタノールを加えて 24 時間振盪した。その後、上澄み液をロータリーエバポレーター（N-1300、EYELA）で濃縮を行い、終濃度が 1 g/mL となるようにメタノール抽出物を調整した。次いで、香辛料残渣に 20 mL の蒸留水を加えて 24 時間振盪した。抽出液は凍結乾燥させた後、終濃度が 1 g/mL となるように水抽出物を調整した。

#### 3. *S. mutans* のバイオフィルム形成量

TSB 培地（30 g/L Tryptic Soy Broth）中で 37°C、一晚培養を行った *S. mutans* を TSBS（30 g/L Tryptic Soy Broth、20 g/L sucrose）培地に濁度（OD<sub>600</sub>）が 0.05 となるように再懸濁した。この懸濁液を 2 mL チューブに添加し、37°C で 24 時間静置培養を行った。その後、*S. mutans* 懸濁液を除去した後、チューブ内に形成されたバイオフィルムに生理食塩水（対照区）、あるいは、濃度が 1%（各抽出物の終濃度は 10 mg/mL）となるように香辛料抽出物を加えた生理食塩水（処理区）を添加した。バイオフィルム剥離効果の検証は 37°C、12 時間の静置培養後に行った。バイオフィルム形成量は既報の通りに行った（Ueda and Wood, 2009）<sup>1)</sup>。少なくとも 3 度の反復

表1 定量的遺伝子発現解析に使用したプライマー配列

Gene	Forward primer sequences (5'-3')	Reverse primer sequences (5'-3')
<i>16S rRNA</i>	CCTACGGGAGGCAGCAGTAG	CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA
<i>gtfB</i>	AGCAATGCAGCCAATCTACAAAT	ACGAACCTTGCCGTTATTGTCA
<i>gbpB</i>	ATGGCGGTTATGGACACGTT	TTTGGCCACCTTGAACACCT
<i>gbpC</i>	AATTCTGATACTGTTGCAGCACCTA	TTCTGTTGCAGCCGGTCT
<i>brpA</i>	GGAGGAGCTGCATCAGGATTC	AACTCCAGCACATCCAGCAAG

実験を行い、その平均値と標準誤差を示した。

#### 4. 定量的遺伝子発現解析

*S. mutans* のバイオフィーム形成に関与する遺伝子群 (*gtfB*, *gbpB*, *gbpC*, *brpA*) について定量的遺伝子発現解析を行った (表1)。*S. mutans* から抽出した RNA は Thunderbird SYBR qRT PCR Mix (東洋紡) と StepOne Realtime PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写と定量的 PCR を行った。発現量は *16S rRNA* 遺伝子を内部標準として、 $\Delta\Delta Ct$  法を用いて解析した。

#### 結果および考察

18 種類の香辛料から調整したメタノール抽出物と水抽出物を用いて *S. mutans* のバイオフィーム剥離効果を検証した。メタノール抽出物の中ではベイリーフやサンショウ、トウガラシはそれぞれ 26%、24%、21% のバイオフィーム剥離効果を示した (図1)。水抽出物の中ではスターアニスやブラックペ

パー、マスタードシードがそれぞれ 18%、17%、16% のバイオフィーム剥離効果を示した (図2)。

次いで、これらの香辛料抽出物が持つバイオフィーム形成抑制効果を検証した。メタノール抽出物の中ではローズマリーやクローブス、サンショウがそれぞれ 94%、92%、83% のバイオフィーム形成抑制効果を示した (図3)。水抽出物の中ではクローブスやローズマリー、クミンがそれぞれ 90%、45%、40% のバイオフィーム形成抑制効果を示した (図4)。

以上の結果から、バイオフィーム剥離効果やバイオフィーム形成抑制効果はメタノール抽出物でより強く見られた。特にベイリーフやサンショウはバイオフィーム剥離と形成抑制の両方の効果を持つことが分かったほか、ローズマリーは特に高いバイオフィーム形成抑制効果を持つことが分かった。ベイリーフについてはこれまでに、その精油成分であるオイゲノールがバイオフィーム形成抑制効果を持つことが示されている。そこでローズマリーとサンショウについてさらに詳細な解析を行った。

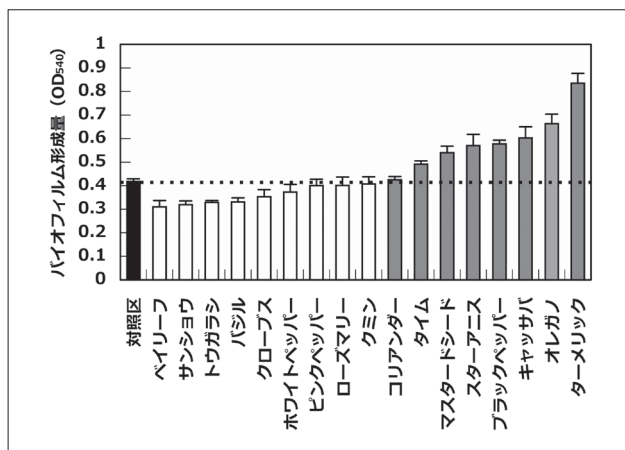


図1 香辛料メタノール抽出物のバイオフィーム剥離効果

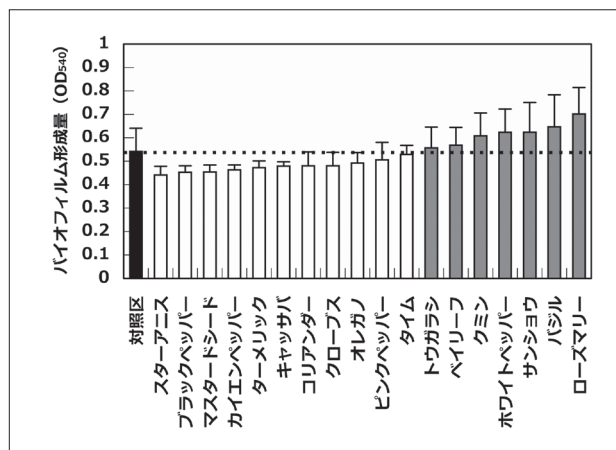


図2 香辛料水抽出物のバイオフィーム剥離効果

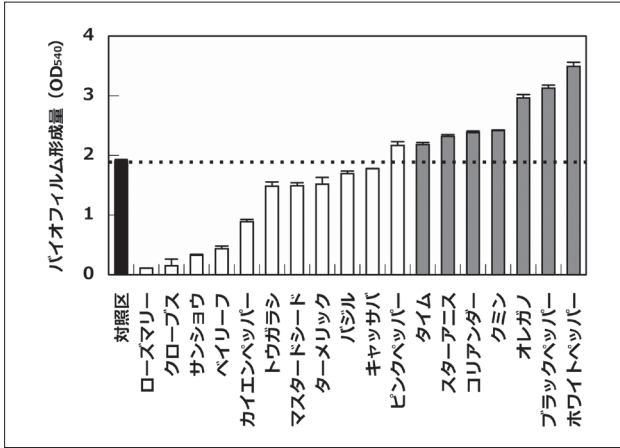


図3 香辛料メタノール抽出物のバイオフィルム形成抑制効果

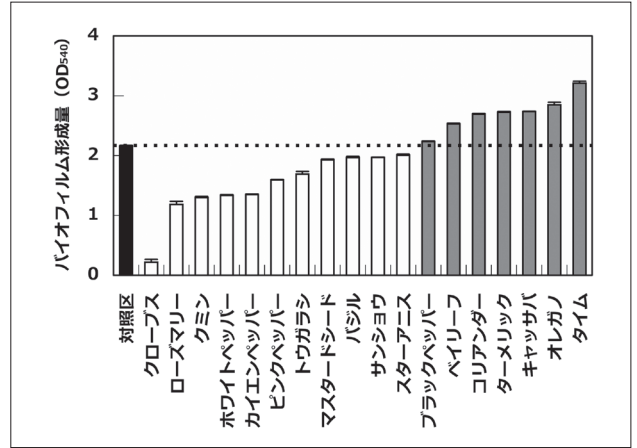


図4 香辛料水抽出物のバイオフィルム形成抑制効果

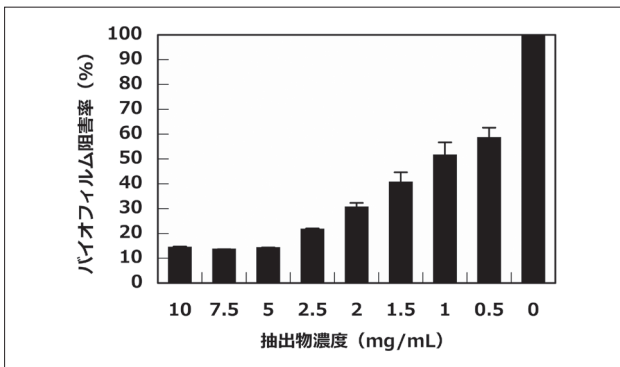


図5 サンショウメタノール抽出物のバイオフィルム阻害率

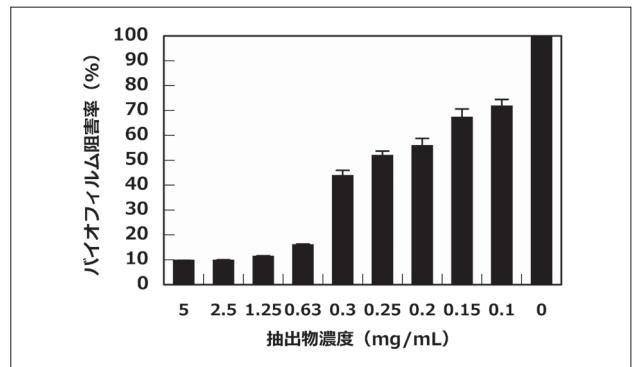


図6 ローズマリーメタノール抽出物のバイオフィルム阻害率

香辛料メタノール抽出物が持つ最小バイオフィルム阻害濃度（バイオフィルム形成量が50%に減少する濃度）を調べたところ、サンショウでは約1 mg/mL、ローズマリーでは約0.25 mg/mLであることが分かった（図5、図6）。より低濃度でバイオフィルム阻害効果を示したことから、ローズマリー抽出物にはバイオフィルム形成抑制効果を持つ物質が含まれることが分かった。同濃度のローズマリーを *S. mutans* 培養液に添加したところ、生育量が約11%減少していたことから、ローズマリー抽出物には弱ながらも *S. mutans* に対する抗菌作用があることが分かった（表2）。

表2 ローズマリー抽出物の *S. mutans* の生育への影響

処理区	細菌数 (Log <sub>10</sub> CFU/mL)
培養開始時	4.63 ± 0.17
培養10時間後(対照区)	5.70 ± 0.28
培養10時間後(ローズマリー処理区)	5.05 ± 0.25

ローズマリー抽出物が持つバイオフィルム形成抑制機構について考察するため、バイオフィルム形成に関わる遺伝子群 (*gtfB*, *gbpB*, *gbpC*, *brpA*) の定量的発現解析を行った。対照区と比較した場合、ローズマリー処理区では *gtfB* 遺伝子の発現量がおよそ1.9倍に増加したほか、*gbpC* 遺伝子の発現量が0.3倍に減少していることが分かった（図7）。*gtfB* 遺

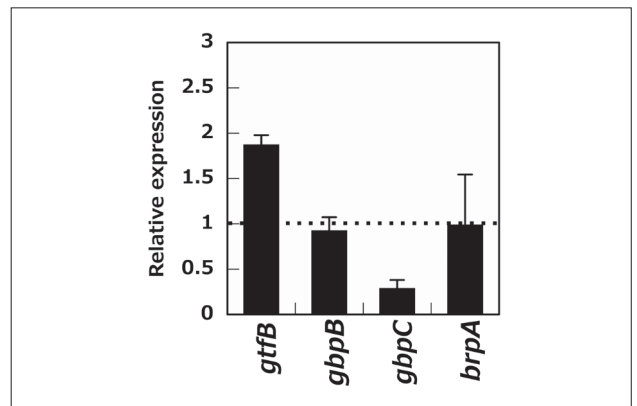


図7 ローズマリー抽出物が *S. mutans* バイオフィルム関連遺伝子群の発現に及ぼす影響

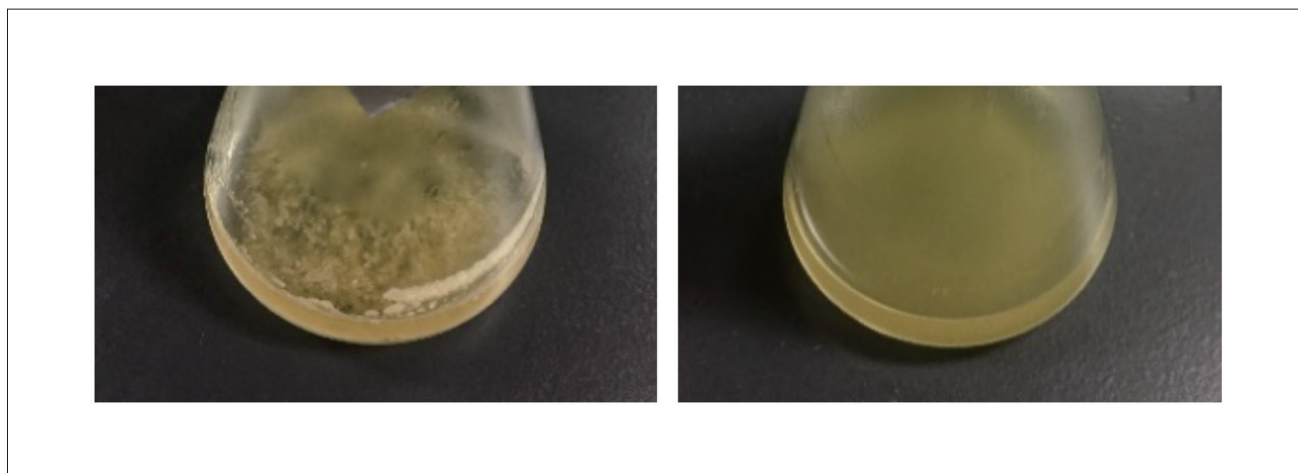


図8 ローズマリー抽出物が *S. mutans* 培養時の凝集に及ぼす影響。(左) 対照区、(右) ローズマリー処理区

伝子産物は細胞外多糖類であるグルカンの生産に関与しており (Koo et al., 2003)<sup>2)</sup>、ローズマリー抽出物処理下では gtfB による多糖類の生産性が向上することが示唆された。一方で、*gbpB* 遺伝子や *gbpC* 遺伝子はグルカン結合タンパク質の生産に関わっており、これらのタンパク質は細胞同士の凝集作用に関与していることが分かっている (Zhu et al., 2009)<sup>3)</sup>。細胞凝集もまたバイオフィーム形成を促進することが知られているが、*S. mutans* 培養時における細胞同士の凝集程度はローズマリー添加時には抑制されていた (図8)。なおデータを掲載していないものの、サンショウでも細胞凝集を抑制する作用が示されている。

以上の結果から、いくつかの香辛料抽出物は *S. mutans* のバイオフィーム制御に有効であることが示された。引き続き、*S. mutans* のバイオフィーム制御に効果的な香辛料の探索とその有効成分の同定を行うことで、香辛料の有効利用に貢献できると期待される。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団と財団関係者の皆様に深く感謝いたします。また、本研究に従事し、精力的に研究を推進してくださった広島大学大学院生物圏科学研究科 守屋拓真君と広島大学生物生産学部 上山梨絵さんに心より感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Ueda, A., Wood, T.K. (2009) Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathogens* 5(6):e1000483.
- 2) Koo, H., Hayacibara, M.F., Schobel, B.D., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Park, Y.K., Vacca-Smith, A.M., Bowen, W.H. (2003) Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and *tt*-farnesol. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 782-789.
- 3) Zhu, M., Ajdić, D., Liu, Y., Lynch, D., Merritt, J., Banas, J.A. (2009) Role of the *Streptococcus mutans irvA* gene in GbpC-independent, dextran-dependent aggregation and biofilm formation. *Applied Environmental Microbiology* 75(22): 7037-7043.

## Screening of effective spice extracts for biofilm dispersal

Akihiro UEDA

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University

### Abstract

Dental caries are caused by biofilm-forming oral bacteria. Accordingly, controlling both biofilm formation and dispersal is important to decrease the risk of tooth decay. The aim of this study was to screen effective spice extracts to induce the dispersal of *S. mutans* biofilm. Methanol and water extracts prepared from 18 spices were tested to evaluate their ability to induce biofilm dispersal. Methanol extracts from bay leaf, Japanese pepper, and chili pepper induced the dispersal of *S. mutans* biofilm by 26%, 24%, and 21%, respectively. Inhibition of biofilm formation was also studied using these spice extracts, with the results showing that methanol extracts from rosemary, cloves, and Japanese pepper strongly inhibited biofilm formation by *S. mutans*. Among these effective spice extracts, the minimal inhibitory concentration against *S. mutans* biofilm was determined for rosemary (0.25 mg/mL) and Japanese pepper (1 mg/mL). At 0.25 mg/mL, rosemary inhibited the growth of *S. mutans* by 11% during a 10 h culture. A quantitative expression analysis showed that both rosemary and Japanese pepper suppressed the expression of the *gbpC* gene. The GbpC protein participates in cell aggregation, which strongly promotes biofilm establishment by *S. mutans*. Thus, our results indicated that these spice extracts are effective in the control of *S. mutans* biofilm by dispersal and/or inhibition of cell aggregation.